

# AMINO ACID SEQUENCE OF ANTICANCER HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY AND DNA BASE SEQUENCE CAPABLE OF CODING THE SAME

Publication number: JP6141884

Publication date: 1994-05-24

Inventor: HAGIWARA HIDEAKI; AOZUKA YASUYUKI

Applicant: HAGIWARA YOSHIHIDE

Classification:

- international: A61K39/395; C12N15/13; C12P21/08; G01N33/574; G01N33/577; A61K39/395; C12N15/13; C12P21/08; G01N33/574; G01N33/577; (IPC1-7): C12P21/08; A61K39/395; C12N15/13; G01N33/574; G01N33/577

- european:

Application number: JP19920321418 19921106

Priority number(s): JP19920321418 19921106

Report a data error here

## Abstract of JP6141884

**PURPOSE:**To obtain a new DNA, capable of binding to a cancer antigen and useful for improving the production of an antibody CLN-IgG capable of suppressing the proliferation of a cancerous cell and enhancing the anticancer activity of the antibody. **CONSTITUTION:**This DNA contains a base sequence capable of coding hypervariable regions Hv1, Hv2 and/or Hv3 having amino acid sequences of formulas I to III and coding at least a part of a heavy chain variable region of an immunoglobulin, e.g. a DNA capable of coding an amino acid sequence of formula IV. The DNA is obtained by preparing an mRNA from a CLN/SUZ- H11, screening the resultant cDNA lambda phage library by a plaque hybridization method and determining the base sequence of the transduced DNA of the isolated phage clone.

K<sub>1</sub>: Asn Tyr Ala Met Ser

I

K<sub>2</sub>: Ser Ala Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn

II

K<sub>3</sub>: Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr

III

Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Asp<sup>10</sup>  
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu<sup>20</sup>  
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser<sup>30</sup>  
Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala<sup>40</sup>  
Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val Ser Ala<sup>50</sup>  
Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr<sup>60</sup>  
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile<sup>70</sup>  
Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr<sup>80</sup>  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Gln Asp<sup>90</sup>  
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Val Pro<sup>100</sup>  
Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr Trp<sup>110</sup>  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>120</sup>  
Ala

IV

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-141884

(43) 公開日 平成6年(1994)5月24日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
A 6 1 K 39/395	V	9284-4C		
	Y	9284-4C		
		8310-2 J	G 0 1 N 33/53	D
		8931-4B	C 1 2 N 15/00	C
審査請求 未請求 請求項の数10(全 11 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平4-321418

(22) 出願日 平成4年(1992)11月6日

(71) 出願人 000234074

萩原 義秀

兵庫県宝塚市平井山荘4番14号

(72) 発明者 萩原 秀昭

兵庫県宝塚市平井山荘4番14号

(72) 発明者 青塚 康幸

兵庫県神戸市西区月が丘5丁目1の4 1-517

(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

(54) 【発明の名称】 抗癌ヒトモノクローナル抗体のアミノ酸配列及びそれをコードするDNA塩基配列

(57) 【要約】

【構成】 ヒト子宮癌患者のB細胞とヒトリンパ芽球細胞株とのヒト/ヒト融合細胞株CLN/SUZ H11が産生する癌細胞抗原特異的ヒト免疫グロブリンCLN-IgGの重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列及びその遺伝子の塩基配列。

【効果】 上記アミノ酸配列及び塩基配列は、ヒトの疾患の予防、治療、診断などの医学及び薬学分野や、生化学的試薬、生体高分子の精製試薬などの薬理学、生化学分野などにおいて有用である。

1

2

【特許請求の範囲】

\*【化1】

【請求項1】 下記のアミノ酸配列

\*

H<sub>V</sub>1: Asn Tyr Ala Met SerH<sub>V</sub>2: Ser Ala Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr AsnH<sub>V</sub>3: Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr

を有する超可変領域H<sub>V</sub>1、H<sub>V</sub>2及びH<sub>V</sub>3から選ばれる少なくとも1つの超可変領域を含むことを特徴とする免疫グロブリン重鎖可変領域断片。

※【請求項2】 下記のアミノ酸配列  
【化2】

※10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp<sup>10</sup>Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu<sup>20</sup>Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser<sup>30</sup>Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala<sup>40</sup>Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala<sup>50</sup>Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr<sup>60</sup>Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile<sup>70</sup>Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr<sup>80</sup>Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp<sup>90</sup>Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Val Pro<sup>100</sup>Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr Trp<sup>110</sup>Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>120</sup>

Ala

を有する免疫グロブリン重鎖可変領域断片。

★【化3】

【請求項3】 下記のアミノ酸配列

★30

H<sub>V</sub>1: Asn Tyr Ala Met SerH<sub>V</sub>2: Ser Ala Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr AsnH<sub>V</sub>3: Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr

を有する超可変領域H<sub>V</sub>1、H<sub>V</sub>2及びH<sub>V</sub>3から選ばれる少なくとも1つの超可変領域をコードする塩基配列を含むことを特徴とする免疫グロブリン重鎖可変領域の少なくとも一部をコードするDNA及びRNA断片。

【請求項4】 請求項2記載のアミノ酸配列をコードするDNA及びRNA塩基配列。

【請求項5】 下記の塩基配列  
【化4】

10	20	30	40	50	60
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTACAGCCTGGGGGGTCGCTGAGACTC					
70	80	90	100	110	120
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGCAACTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT					
130	140	150	160	170	180
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCGATTACTCCTAGTGGTGGTAGTACAAATTAT					
190	200	210	220	230	240
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAGAATACACTGTAT					
250	260	270	280	290	300
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGGGAGAGTCCCA					
310	320	330	340	350	360
TATAGAAGCACTTGGTACCCTTTATATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTCTCA					
GCC					

3

4

を有する請求項4記載のDNA塩基配列及びこれに対応するRNA塩基配列。

【請求項6】 下記のアミノ酸配列

【化5】

H<sub>V</sub>1: Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala

H<sub>V</sub>2: Ala Ala Ser Ser Leu His Ser

H<sub>V</sub>3: Tyr Ser Thr Tyr Pro Ile

\*を有する超可変領域H<sub>V</sub>1、H<sub>V</sub>2及びH<sub>V</sub>3から選ばれる少なくとも1つの超可変領域を含むことを特徴とする免疫グロブリン軽鎖可変領域断片。

【請求項7】 下記のアミノ酸配列

【化6】

\*

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser 10

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr 20

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser 30

Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro 40

Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala 50

Ala Ser Ser Leu His Ser Lys Val Pro Thr 60

Gln Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp 70

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln 90

Tyr Ser Thr Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gly 100

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

を有する免疫グロブリン軽鎖可変領域断片。

【請求項8】 下記のアミノ酸配列

【化7】

H<sub>V</sub>1: Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala

H<sub>V</sub>2: Ala Ala Ser Ser Leu His Ser

H<sub>V</sub>3: Tyr Ser Thr Tyr Pro Ile

※を有する超可変領域H<sub>V</sub>1、H<sub>V</sub>2及びH<sub>V</sub>3から選ばれる少なくとも1つの超可変領域をコードする塩基配列を含むことを特徴とする免疫グロブリン軽鎖可変領域の少なくとも一部をコードするDNA及びRNA断片。

30 【請求項9】 請求項7記載のアミノ酸配列をコードするDNA及びRNA塩基配列。

【請求項10】 下記の塩基配列

【化8】

※

10	20	30	40	50	60
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC					
70	80	90	100	110	120
ATCACTTGTTCGGGCGAGTCAGGACATTAGTAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCA					
130	140	150	160	170	180
GGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCACAGTAAGGTCCCAACA					
190	200	210	220	230	240
CAATTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT					
250	260	270	280	290	300
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCTACAGTATAGTACTTACCCTATCACCTTCGGCGGA					
310	320				
GGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA					

を有する請求項9記載のDNA塩基配列及びこれに対応するRNA塩基配列。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、たとえば、ヒトの疾患の予防、治療、診断などの医学及び薬学分野や、生化学的試薬、生体高分子の精製試薬などの薬理学、生化学分

野などの広い分野において有用な抗原特異的ヒト免疫グロブリンの可変領域の構造に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒト子宮癌患者のB細胞とヒトリンパ芽球細胞株とのヒト/ヒト融合細胞株CLN/SUZ H11が産生する癌細胞抗原特異的ヒト免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列ならびにその遺伝子の塩基配列に関する。

## 【0002】

【従来の技術】細胞融合あるいは細胞の不活化によるモノクローナル抗体作成の技術の開発以来、多くの有用な抗体が主にマウスなどを使って得られてきた。そのなかでも悪性腫瘍細胞に対するモノクローナル抗体は、腫瘍抗原の解析等の基礎研究への利用のほかに、血清診断、標識化抗体による腫瘍の画像診断などに利用されはじめ、その利用価値はきわめて高い。しかし、マウス等の異種抗体はヒトにとって異物であり、ヒトに頻回投与することは投与抗体に対する免疫反応を惹起し、その結果、副作用並びに抗体の治療または予防効果の低下を引き起こす。以上の点から、ヒトの癌の予防、治療、体内診断など、実際に抗体をヒトに投与する臨床分野を考えると、ヒト型の抗体を用いることが望ましい。しかし、ヒト型のモノクローナル抗体は、その作成が困難であることから、現在のところほとんど実用に供されていない。

【0003】このような状況の中で本発明者の一人は、特開昭58-201994号公報（特公平01-59878号公報）、特開昭59-135898号公報および特開昭59-137497号公報に詳しく開示されているごとく、ヒト癌細胞に高い反応性を有するヒトモノクローナル抗体を産生する細胞株CLN/SUZ H11（ATCC No. HB8307）を樹立した。この細胞株が産生する抗体（CLN-IgGと命名）は、抗体クラスがIgG、アイソタイプが $\gamma$ 1型および $\kappa$ 型であり、免疫組織学的に癌細胞の表面に存在する癌抗原に結合し、なおかつ癌細胞の増殖を抑制する効果をもつという興味ある知見が得られている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】このような技術背景の中で、以下に述べる如き解決すべき課題がある。

【0005】1) モノクローナル抗体産生細胞株は、一般に継代と共にその抗体産性能の低下することが知られている。また一般的に言って、ヒトハイブリドーマはマウスのそれと比較して抗体の産生量が低い。ヒトモノクローナル抗体を癌治療や診断に用いる場合、大量の抗体が必要であり、この問題の解決は必須である。

【0006】2) 現在の免疫学の知見によれば、モノクローナル抗体がヒト癌細胞に結合し、抗体それ自体の作用で癌細胞の増殖を抑制し、あるいは癌細胞を死滅させる機構が知られている。更にはまた、補体もしくはK-細胞やマクロファージなどの助けを借りて癌細胞の増殖を抑制し、癌細胞の死滅を引き起こすことが知られている。しかし、これらの効果は実際のところ期待されるほど強力ではなく、それゆえ更に抗体の抗癌活性を上昇させる試みが必要である。

【0007】以上のような課題の解決手段、すなわち抗体産生量の改善と抗体の抗癌活性の上昇を具体化するひとつの手段として遺伝子操作による方法がある。例えば

1) の問題の場合、抗体遺伝子をクローニングした後、動物細胞や大腸菌などの宿主細胞に遺伝子を導入し、抗体遺伝子を発現させ、抗体を多量に得る方法によって解決することが考えられ、また2) の問題の場合、抗体遺伝子を人為的に換えることによって、抗体の種々の機能、たとえば抗原との結合親和性や、免疫担当細胞を介した抗癌活性あるいは組織浸潤性を上昇させるように改変したり、さらには本来抗体が持たない機能、たとえば細胞毒性、酵素活性、免疫誘導活性などを抗体分子にもしくはその断片に付加することで、より抗癌活性の高い分子をデザインすることが考えられる。

【0008】これらの目的を達成するためには、抗体遺伝子の分離さらに構造の解明が重要である。しかしながら、該CLN-IgGモノクローナル抗体を構成する軽鎖と重鎖の構造、さらには抗原と特異的に結合する機能を有する可変領域の遺伝子構造についてはこれまで全く知られていない。

【0009】そこで本発明の主たる目的は、該CLN-IgGモノクローナル抗体の軽鎖と重鎖の遺伝子構造を解明することにある。

## 【0010】

【課題点を解決するための手段】本発明者らは、該CLN-IgGモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖をコードするcDNAを分離し、該DNA塩基配列を解明し、またその配列より該抗体の軽鎖及び重鎖可変領域のアミノ酸配列を決定し本発明を完成するに至った。

【0011】具体的には、CLN/SUZ H11よりmRNAを調製し、そこから作成したcDNAラムダファージ・ライブラリーを、ブラクハイブリダイゼーション法によりスクリーニングし、単離したファージクロンの挿入DNAの塩基配列を決定することにより達成された。以下本発明について更に詳細に説明する。

【0012】本発明によれば、CLN-IgGモノクローナル抗体軽鎖可変領域および重鎖可変領域のDNA塩基配列は、PCR法（ポリメラーゼ鎖反応法）により増幅したヒト抗体遺伝子断片をプローブとして、CLN-IgGモノクローナル抗体軽鎖および重鎖のcDNAをクローニングし、該DNA塩基配列を解析することにより決定された。以下、これらの工程について更に詳細に説明する。

## 【0013】 [1] mRNA単離精製

本発明において使用される細胞株は、ヒト子宮癌患者リンパ球とヒトリンパ芽球を融合させたヒト/ヒトハイブリドーマであり、具体的には特開昭58-201994号公報（特公平01-59878号公報）に詳しく開示され、ヒト脳腫瘍、肺ガン、胃ガン、悪性黒色腫などのごく癌細胞の細胞表面抗原に特異的に反応するヒト型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマCLN-SUZ H11である。このハイブリドーマはATCC（American Type Culture Collection）に登録番号

HB8307として登録されている。

【0014】この細胞を適当な条件下、例えば37℃炭酸ガス濃度5%の条件下、5%牛胎児血清を含む培養液、たとえばRDF培地中で培養増殖させ、得られる細胞を遠心分離によって集めた後、細胞から常法、例えばHanらのグアニジウムチオシアネート法 [Han, J. H., Stratowa, C., & Rutter, W. J. (1987) Biochemistry, 26, 1617-1625] により全RNAを抽出し、ついでこれを常法、例えばオリゴdTセルロースを用いる吸着カラムクロマトグラフィーまたはバッチ法によりポリ(A)+RNA画分を分離精製する。

【0015】得られるポリ(A)+RNAはさらにcDNAライブラリーの作製に利用することができる。本発明においては、具体的にはCLN-SUZ H11ハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出し、この抽出物からオリゴdTセルロースカラムを用いてポリ(A)+RNAを精製し、以下のcDNAライブラリーの作製に供した。

#### 【2】cDNAライブラリーの作製

【1】の工程で得られるポリ(A)+RNAを鋳型とし、ポリAに対応するオリゴdT、あるいは抗体の定常領域に対応すると考えられる塩基配列を有する合成ヌクレオチドをプライマーとして、dATP、dGTP、dTTP、dCTPの存在下で逆転写酵素によりmRNAと相補的な一本鎖DNAを合成する。次いで大腸菌RNA分解酵素HでRNAを断片化した後、この一本鎖DNAを鋳型として、大腸菌DNAポリメラーゼIを用いて二本鎖cDNAを合成する。こうして得られるcDNAに、たとえばEcoRIリンカーを連結後、EcoRI消化することによって粘着末端を導入することができる。得られる断片を適当なファージベクター、たとえばλgt10ベクター、λgt11ベクターなどのEcoRI部位に連結した後、インビトロパッケージングを行い、cDNAライブラリーを作製することができる。

【0016】本発明の具体的操作においては、【1】の工程で得られるポリ(A)+RNAを鋳型としcDNAを合成し、このcDNAをλgt10ベクターに連結しcDNAライブラリーを作製した。

#### 【0017】【3】プローブの作製

プローブとしては、ヒト免疫グロブリン軽鎖又は重鎖の定常領域あるいは可変領域の遺伝子もしくはその断片、あるいはその部分のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成したものまたはニクトランスレーション法により<sup>32</sup>P、ビオチンなどで標識を行ったものを用いることができる。

【0018】本発明において好適には、cDNAを鋳型に、抗体の軽鎖および重鎖の一部に相当する配列をプライマーにして行ったPCRにより増幅された断片を、ニクトランスレーション法によりビオチン化したものをプローブとすることができる。

#### 【0019】【4】cDNAのクローニング

【2】の工程で得られるcDNAライブラリーを、【3】の工程で得られるプローブを用いることにより目的とするクローンの選択を行う。例えば【2】の工程で得られるcDNAライブラリーのλgt10ファージを大腸菌株(C600Hfr-)に感染させることでプラークを形成させ、さらにプラークハイブリダイゼーション法によって陽性クローンを選別する。これにより、CLN-IgG重鎖cDNAクローンとしてλCLN-G111が、CLN-IgG軽鎖cDNAクローンとしてλCLN-K411が選択され塩基配列決定に供された。

#### 【0020】【5】塩基配列の決定

【4】の工程で得られるcDNAクローンは、たとえばpUC18のようなプラスミッドベクターやM13ファージなどのファージベクターあるいはpUC118、pBluescript SK+などのファージミッドベクターに再クローニング化し、得られるサブクローンの挿入部分のDNA塩基配列をマキシム、ギルバート法やサンガー法を用いて塩基配列を決定することができる。

【0021】本発明の具体的操作においては、【4】の工程で得られるλCLN-G111およびλCLN-K411のEcoRI断片を、pBluescript SK+に再クローニング化後、ヘルパーファージR408感染により一本鎖DNAを調製し、サンガー法によりその塩基配列を決定した。

【0022】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 【0023】

##### 【実施例】

実施例1：ハイブリドーマCLN/SUZ H11からのmRNA (ポリ(A)+RNA) の単離精製

ヒト/ヒトハイブリドーマCLN/SUZ H11からmRNA画分を得た方法は以下のとおりである。

【0024】CLN/SUZ H11細胞から、グアニジウムチオシアネート法 [Han, J. H., Stratowa, C., & Rutter, W. J. (1987). Biochemistry, 26, 1617-1625] により、全RNAを調整した。培養細胞10<sup>9</sup>個を遠心分離で集め生理食塩水で洗浄する。800rpmで遠心し集めた細胞の沈殿に、あらかじめ氷冷しておいた8%2-メルカプトエタノールを含む5Mグアニジウムチオシアネートを20ml加え、すみやかにホモジェナイズする。その細胞破砕液を、あらかじめ7.5mlのエタノールをいれ-20℃で冷やしておいたポリプロピレン遠心チューブに入れて混合し、即座に10,000rpmで5分間遠心する。得られた沈殿にあらかじめ氷冷しておいた8%2-メルカプトエタノールを含む5Mグアニジウムチオシアネートを10ml加えホモジェナイズした後、そこへ1M酢酸0.25mlと7.5mlの冷エタノールを加え、-20℃で一晩放置する。10,000rpmで10分間遠心分離

し得られた沈殿を10mM 2-メルカプトエタノールを含む6M塩酸グアニジン10mlに溶解し、さらに1M酢酸0.25mlと5mlの冷エタノールを加え-20℃で3時間放置する。10,000rpmで10分間遠心分離し得られた沈殿を6M塩酸グアニジン5mlに溶解し1M酢酸0.125mlと2.5mlの冷エタノールを加え-20℃でさらに3時間放置する。10,000rpmで10分間遠心分離し得られた沈殿を滅菌純水5mlに溶解し、21M酢酸ナトリウム0.5mlおよび冷エタノール12.5ml加え-20℃で全RNA分画として保存する。

【0025】ポリ(A)+RNAは、上述の方法で得られた全RNA分画からChirgwinの方法[Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., & Rutter, W. J. (1979) Biochemistry, 18, 5294-5299]を用いて調製した。まずCLN/SUZ H11細胞の全RNA 9mgを純水に解かし2.5mg/mlとする。100℃で5分間熱処理し、氷上で急冷した後、5M塩化リチウム、10%

SDS、1Mトリエタノールアミン塩酸pH7.4をそれぞれ最終濃度0.5M、0.2%、10mMになるように加える。その溶液を、あらかじめ結合緩衝液(0.5M塩化リチウム、0.2%SDS、10mMトリエタノールアミン塩酸pH7.4)で平衡化しておいたオリゴ(dT)セルロースカラムにかける。さらにカラム体積の10倍の結合緩衝液で洗浄する。カラムに結合したポリ(A)+RNAを溶出緩衝液(10mMトリエタノールアミン塩酸pH7.4)で溶出し、RNA分画を集める。得られたポリ(A)+RNA溶液は100℃で5分間熱処理した後、上述のオリゴ(dT)セルロースカラムを用いたクロマトグラフィーを新しいカラムをつかってもう一度繰り返す。RNAは、溶出液に2.5倍量のエタノールと1/10量の2M酢酸ナトリウムを加え、10,000xgの遠心分離した後の沈殿として回収する。精製ポリ(A)+RNA沈殿を滅菌純水に溶解し2μg/μlの濃度で-70℃で保存する。

【0026】実施例2: CLN/SUZ H11ライブラリーの作成

実施例1で得られたポリ(A)+RNA 4μgを用い、アマシャム社のcDNA合成キットのプロトコールに従\*

合成DNA (プライマーNo.1)

5'-GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGC-3'

合成DNA (プライマーNo.2)

5'-AACTTTCTTGTTCCACCTTGGTGTGCTGGG-3'

【0030】この2種類のプライマーを用いて実施例2で調製したCLN/SUZ H11cDNA 4ngをテン

\*い、cDNAを合成した3.2μg回収した。このcDNA断片をEcoRIメチラーゼ処理後、EcoRIリンカーをT4 DNAリガーゼを用いて連結した。EcoRI消化後、アマシャム社製カラムによりEcoRI末端を有するcDNA分画を回収した。このcDNA 100ngをλgt10ベクター(ストラタジーン社製)1μgに連結後、in vitroパッケージングをパッケージングキット(GIGAPACK GOLD; ストラタジーン社製)を用いて行いCLN/SUZ H11cDNAライブラリー7.8×10<sup>6</sup>pfu/μg DNAを作成した。

【0027】実施例3: プロテインシーケンサーによるCLN-IgGのアミノ酸配列の決定

精製CLN-IgGを還元後、ゲルろ過により精製した重鎖および軽鎖のそれぞれ30μgをプロテインシーケンサー477A(アブライトバイオシステムズ社製)にかけ、N末端からのアミノ酸配列を約30残基決定した。また重鎖を臭化シアンによりメチオニン特異的に切断し断片を逆相液体クロマトグラフィーで分離精製後、同様に一部のアミノ酸配列を決定した。

【0028】実施例4: プローブの作成法

(1) 重鎖のプローブ

実施例3で決定したCLN-IgG重鎖の部分アミノ酸配列とホモロジーをもつ配列をNBRF蛋白質データベース(NBRF-PDB; National Biomedical Research Foundation Protein Data Base)から検索した結果、ヒト免疫グロブリンgerm line VH26(エンタリー名H3HU26, Accession number A02047)が最も高いホモロジーを持つことがあきらかとなった。そこでEMBL DNAデータベース(EMBL-GDB; European Molecular Biology Laboratory Gene Data Base)にあるVH26のDNA配列(ID名HSIGHAU, Accession number M17747)のうちからN末端アミノ酸10残基に相当する30ヌクレオチド(プライマーNo.1)を合成した。また重鎖γ1CH1ドメインのDNA配列(EMBL-GDB; ID名HSIGCC4, Accession number J00228)のC末端側アミノ酸10残基に相当する30ヌクレオチド(プライマーNo.2)を合成した。

【0029】

【化9】

プレートにPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を行った。その結果、約660塩基対の断片(PCRγC3)が増幅

され、塩基配列決定により抗体重鎖 $\gamma 1$  CH1ドメインおよび可変領域に相当することがあきらかとなった。この $\gamma C 3$ をニックトランスレーションの方法でビオチン化しプローブ（ビオチン化PCR $\gamma C 3$ ）を得た。

#### 【0031】 (2) 軽鎖のプローブ

実施例3で決定したCLN-IgG軽鎖の部分アミノ酸配列とホモロジーをもつ配列をNBRF蛋白質データベースから検索した結果、Daudi細胞由来のヒト免疫グロブリン（エントリ名K1HUDI、Accession number A01884）の配列と最も高いホモロジーがあった。そこで\*10

#### 合成DNA（プライマーNo.3）

5'-GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC-3'

#### 合成DNA（プライマーNo.4）

5'-CTAACACTCTCCCTGTTGAAGCTCTTTGT-3'

【0033】 この2種類のプライマーを用いて実施例2で調製したCLN/SUZ H11cDNA 4ngをテンプレートにPCRを行った。その結果、約660塩基対の断片（PCR $\kappa A 4$ ）が増幅され、塩基配列決定により抗体軽鎖（ $\kappa$ 鎖）Cドメインおよび可変領域に相当することがあきらかとなった。このPCR $\kappa 4$ をニックトランスレーションの方法でビオチン化しプローブ（ビオチン化PCR $\kappa A 4$ ）を得た。

#### 【0034】 実施例5：cDNAのクローニング

##### (1) 重鎖cDNAのクローニング

前記実施例2で得られたCLN/SUZ H11cDNAライブラリーに対して実施例4で得られたビオチン化プローブを用いてブラークハイブリダイゼーションを行い13個の陽性クローンを得た。この中のクローンのひとつは約1.6K塩基対の挿入DNAを持っており、このファージをλCLN-G111と命名した。

##### 【0035】 (2) 軽鎖cDNAのクローニング

前記実施例2で得られたCLN/SUZ H11cDNA

\*EMBL DNAデータベースにあるDaudi抗体軽鎖のDNA配列（ID名HSVK02、Accession number X00966）のうちからN末端アミノ酸10残基に相当する30ヌクレオチド（プライマーNo.3）を合成した。また軽鎖（ $\kappa$ 鎖）CドメインのDNA配列（EMBL-GDB；ID名HSIGK1、Accession number V00557）のC末端側アミノ酸10残基に相当する30ヌクレオチド（プライマーNo.4）を合成した。

#### 【0032】

##### 【化10】

Aライブラリーに対して実施例4で得られたビオチン化プローブを用いてブラークハイブリダイゼーションを行い27個の陽性クローンを得た。この中のクローン411は約1.0K塩基対の挿入DNAを持っており、このファージをλCLN-K411と命名した。

#### 【0036】 実施例6：塩基配列の決定

実施例5においてクローン化したλCLN-G111およびλCLN-K411のEcoRI断片をファージミッドBluescript SK<sup>+</sup>に再クローン化した。このファージミッドで形質転換した大腸菌KL1-BlueにヘルパーファージR408を感染させ、一本鎖DNAを調整し、サンガー法（Sanger, F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74; 5463 (1977)）により塩基配列を決定した。その結果得られたCLN-IgG軽鎖cDNAクローンの可変領域の塩基配列およびそれから予測されるアミノ酸配列を以下に示す。

#### 【0037】

##### 【表1】



第1表: CLN-IgG重鎖( $\gamma$ )可變領域断片

AGC CCA GCC CTG GGA TTT TCA GGT GTT TTC ATT TGG TGA TCA GGA CTG AAC AGA GAA CTC

-19 -10 -1

ACC ATG GAC TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTT CTT GTG GCT ATT TTA AAA GGT GTC CAG TGT  
Met Asp Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val Gln Cys

1 10 20

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GAC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCG CTG AGA CTC  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu

30 40

TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGC AAC TAT GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT  
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala

50 60

CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCG ATT ACT CCT AGT GGT GGT ACT ACA AAT TAT  
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr

70 80

GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC CAG AAT ACA CTG TAT  
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr

90 100

CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GTC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT GGG AGA GTC CCA  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Val Pro

110 120

TAT AGA AGC ACT TGG TAC CCT TTA TAT TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA  
Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

GCC  
Ala

[0038]

30 【表2】

第2表: CLN-IgG軽鎖( $\kappa$ )可変領域断片

GGA ATT CCG TCA GGA CAC AGC

-20 -10 -1  
 ATG GAC ATG AGA GTC CTC GCT AGG CTC CTG GGG CTC TGT GCT CTG TCC CAG TGC AGA TGT  
 Met Asp Met Arg Val Leu Ala Arg Leu Leu Gly Leu Cys Ala Leu Ser Gln Cys Arg Cys  
 1 10 20  
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr  
 30 40  
 ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GAC ATT AGT AAT TAT TTA GCC TGG TTT CAG CAG AAA CCA  
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro  
 50 60  
 GGG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTC CAC AGT AAG GTC CCA ACA  
 Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Ser Lys Val Pro Thr  
 70 80  
 CAA TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT  
 Gln Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 90 100  
 GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CTA CAG TAT AGT ACT TAC CCT ATC ACC TTC GGC GGA  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gly

GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA  
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

【0039】またCLN-IgG重鎖および軽鎖のサブグループを決定するためコンピューター検索を行い相同性の高い遺伝子を調べた結果、CLN-IgG重鎖可変領域はサブグループ3に、まだ軽鎖( $\kappa$ 鎖)可変領域はサブグループ1に属することが明かとなった。

#### 【0040】実施例7: 超可変領域の決定

種々の抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を各々比較すると、配列が一定の領域(定常領域)と異なっている領域(可変領域)が存在することがわかる。可変領域の中でも特に変異性に富んでいるところを超可変領域(hyper-variable region, Hv領域)と呼び、重鎖及び軽鎖それぞれ3箇所ずつ存在する。アミノ末端から、それぞれHv1、Hv2、Hv3と呼ぶ。これらの超可変領域は抗原との結合部位を形作り、抗原決定基と直接接触するアミノ酸残基を含んでいると考えられている。そのため超可変領域は、相補性決定領域(CDR; Complementarity determining region)とも呼ばれ、抗体の抗原特異性を支配している領域である。

【0041】CLN-IgGの超可変領域を決定するためにKabat & Wuプロットを用いた。[Kabat, E. A., Wu, T. T., Bilofsky, H. Variable Regions of Immunoglobulin Chains (Medical Comput. Systems, Bolt, Beranek & Newman, Cambridge, 1976)]これは種々の抗体の配列を並べて、各位置ごとに変異度を計算してプロットするものである。ここで

いう変異度とは、「任意の位置における出現アミノ酸の種類数」と「その位置で最も頻繁に出現するアミノ酸の頻度」の比であり、理論的に1から400の値をとる。変異度の値が大きい領域が超可変領域である。

#### 30 【0042】(1) CLN-IgG軽鎖の超可変領域の決定

CLN-IgG軽鎖のアミノ酸配列から、カッパ鎖サブグループ1に属することが明かとなった。そこでNBRF-PDB (rel.26)に含まれているサブグループ1に属する24の配列をCLN-IgG軽鎖と共に並べ、各位置で変異度を計算しKabat & Wuプロットを作製した(図1)。その結果から、Hv1、Hv2、Hv3をそれぞれ残基番号28から34、50から56、91から96と決定した。

#### 40 【0043】(2) CLN-IgG重鎖の超可変領域の決定

CLN-IgG重鎖のアミノ酸配列から、Hvサブグループ3に属することが明かとなった。そこでNBRF-PDB (rel.26)に含まれているサブグループ3に属する21の配列をCLN-IgG重鎖と共に並べ、各位置で変異度を計算しKabat & Wuプロットを作製した(図2、残基番号96まで表示)。その結果、Hv1、Hv2をそれぞれ残基番号31から35、49から59と決定した。Hv3に関しては、重鎖の場合、以下に示すごとく、各配列間で顕著に鎖長が異なるため位置を正確に

17

18

あわせることが困難である。ギャップを考慮せずに変異度を計算すると、残基番号 96 シスチンが 1.0、97 グリシンが 2.1、98 アルギニンが 3.9、99 バリンが 29.3、109 チロシンが 18.4、110 トリプトファンが 3.5、111 グリシンが 1.0 となる。明か\*

\*に残基番号 99 から 109 までの位置で変異度が高く、この領域が H v 3 に相当する。

【0 0 4 4】

【表 3】

```

Kol  CARDGGHGFCSSASCFGPDYWGQGTPTVTVSS
Bro  CARSPVSLVDGWLYYYYGSVWGQGTL
Cam  CAR----DRPLYGDYRAFNYWGQGTTLTVTSS
Tro  CAA----TDDFDWSTFSLDYWGEGDLTVTSS
Tei  CAR----VTPAAASLTFSASVWGQGTTLVT
Pom  CAR----DAGPYVSPTEFFAHYGQGTTLVT
Ga   CAR----SGIALGSAVAGTDYWGEGTLVTISS
Lay  CAR----DAGPYVSPTEFFAHWGQGTTLVT
Hil  CAR----DPDILTAFSFDYWGQGVLTVTSS

```

99
109

```

CLN  CGR-----VPYRSTWYPLYWGQGTTLTVTSSAS
Dob  CAK-----GYIWNNGNWFDSDWGQGTTLTVTS
Was  CAR-----FRQPFVQFFDVEFGQGTTLVT
Bur  CAK-----LIAVAG-TRDFWGQGTTLTVTVSL
Tur  CAR-----LSVTAVAFDVGWQGTTKVS
Til  CAK-----GKVSAYYFDYWGEGTLTVTSS
Zap  CAR-----TRPGGYFSDVWGQGTTLVS
Nie  CAR-----IRDTAMFFAHWGQGTTLTVTSS
Jon  CAR-----VVVSTSMDEVWGQGTPTVT
Gal  CAR-----GWGGGDYWGQGTTLTVTVST
But  CAR-----DLAAARLFKGKTTVTVTSS
WEA  CAR-----GWLLNWGQGTTLTVTSS

```

【0045】

【発明の効果】CLN-IgG抗体及びその遺伝子構造が明らかになったことによって、この遺伝子を動物細胞や大腸菌などの宿主細胞に導入し発現させ、抗体を多量に得ることが可能となる。更には完全抗体のみならず、ある種の抗体断片、たとえば重鎖のみ、軽鎖のみ、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、ドメイン断片(dAb)、CDR断片などの各種抗体由来断片を得ることが可能となる。また更に抗体遺伝子に人為的突然変異を起こすことにより、アミノ酸配列の一部異なる完全抗体もしくは各種抗体由来断片を得ることができる。

【0046】現在までの研究の結果、CLN-IgGは、たとえばヒト胃ガン、肺ガン、脳腫瘍、悪性黒色腫などのときヒト癌細胞に働き、それ自体の作用でこれら癌細胞の増殖を抑制し、或は癌細胞を死滅させ、さらには補体もしくはK-細胞やマクロファージなどの助けを借りて癌細胞の増殖を抑制し、癌細胞の死滅を引き起こす。

ことが期待される。しかし、CLN-IgGの遺伝子を改変し抗体のアミノ酸を一部置換することにより、更に抗体の活性を上昇させることが可能である。たとえば抗原との結合親和性や、免疫担当細胞を介した抗癌活性、あるいは組織への浸潤性などが上昇するように改変できる。さらには、たとえば細胞毒性、酵素活性、免疫誘導活性などを抗体分子もしくはその断片に遺伝子レベルで付加する毒性、酵素活性、免疫誘導活性などを抗体分子もしくはその断片に遺伝子レベルで付加することで、より抗癌活性の高い分子をデザインすることが考えられる。具体例を挙げれば、癌特異的抗体をキャリアーとして利用して、例えば化学療法剤結合-ヒトモノクローナル抗体、インターフェロン結合-ヒトモノクローナル抗体、高分子毒素結合-ヒトモノクローナル抗体、薬物入りリポゾーム結合-ヒトモノクローナル抗体、などの形で癌細胞の増殖抑制や死滅を誘導する薬剤として有用である。また、抗体に放射線感受性物質を結合させて患者

に投与し、癌細胞に選択的に集積させ、治療、診断の効果を上げることも考えられる。このような癌に対する利用に際しては、ヒトモノクローナル抗体として完全な抗体を用いてもよいし、前述したとおり、例えば重鎖のみ、軽鎖のみ、Fab断片、F(ab)<sub>2</sub>断片、Fv断片、ドメイン断片(dAb)、CDR断片などの特異的抗原認識

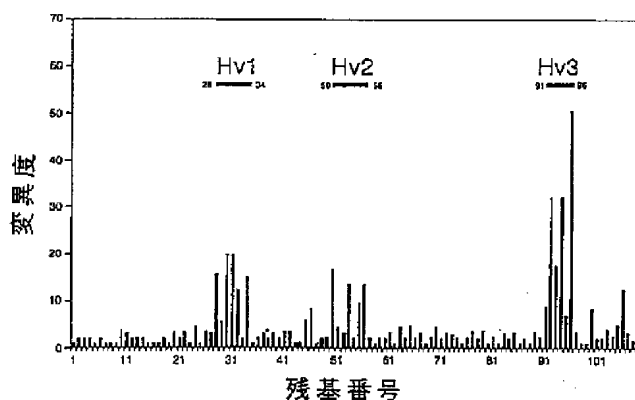
部位を含むより小さな断片を用いることもできる。

【図面の簡単な説明】

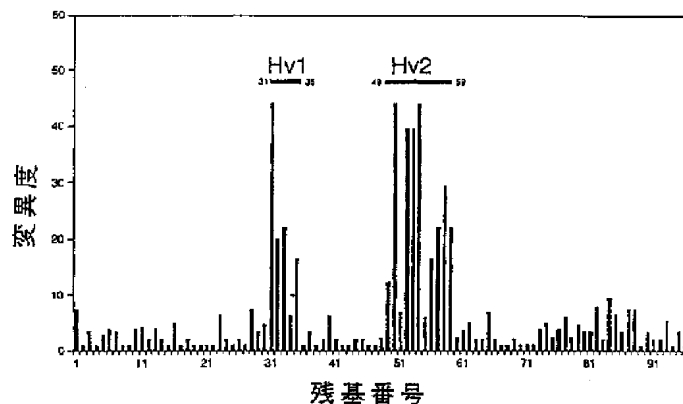
【図1】図1は、ヒトκ鎖サブグループ1に属する24の可変領域配列のKabat & Wu plotを示す。

【図2】図2は、ヒト重鎖サブグループ3に属する21の可変領域配列のKabat & Wu plotを示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

C 1 2 N 15/13

G 0 1 N 33/574

33/577

識別記号

Z N A

庁内整理番号

D 9015-2 J

B 9015-2 J

F I

技術表示箇所